

Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*

Carvalho, HAS¹, Gomes, DS¹, Cascardo, JCM¹, Costa, MG¹, Gesteira, AS¹, Micheli, FFL^{1,2}

¹Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, DCB, UESC, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Ilhéus-BA-Brasil

²Cirad-BIOS, UMR DAP, Montpellier, France
helianacarvalho@gmail.com

Palavras-chave: Interação planta-patógeno, vassoura-de-bruxa, morte celular programada, enzimas proteolíticas

A cacaucultura no sul da Bahia sofreu prejuízos econômicos de grande escala devido à propagação da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Singer. Esse fitopatógeno é hemibiotrófico e provoca vários sintomas no cacauero tendo como maior característica o super brotamento, conhecido como vassoura-de-bruxa. Apesar de muitos esforços no sentido de desenvolver estratégias para conter ou reduzir esses danos, a doença continua avançando. A análise do processo de necrose nos tecidos do cacau durante a infecção pelo *M. perniciosa* mostrou que essa interação envolve um processo de morte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*) e indicadores celulares característicos dessa PCD, como a degradação do DNA, foi identificada (CEITA et al., publicação aceita em *Plant Science*). Estudos moleculares realizados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC, demonstraram a presença de genes de diferentes classes de proteases em bibliotecas de cDNA das interações resistentes e suscetíveis no patossistema *T. cacao*-*M. perniciosa*. Na literatura, essas enzimas estão relacionadas com a PCD nas interações compatíveis ou com uma reação de hipersensibilidade (HR) nas interações incompatíveis. A análise da biblioteca de cDNA da interação entre *T. cacao* e *M. perniciosa* permitiu a identificação de seqüências gênicas de três classes de proteases (serinas, cisteínas e aspárticos). O alinhamento dessas seqüências de proteases com seqüências públicas (Genbank) mostrou que elas possuem similaridades com seqüências de proteases de outras espécies de plantas e com isso foi permitido identificar a presença de regiões conservadas entre esses grupos. A expressão gênica das proteases foi analisada por sqRT-PCR utilizando meristemas de *T. cacao* controle e com a doença vassoura-de-bruxa. O sqRT-PCR foi normalizado a partir da amplificação do gene 18S, que é constitutivamente expresso. A análise da expressão gênica indicou expressão diferencial entre os genes *CYS* (1 e 2) e o *ASP* do *T. cacao*. Os genes *CYS* são mais expressos durante a fase da doença, onde provavelmente as cisteínas proteases estão participando do processo de degradação protéica e que levará mais adiante a morte celular na fase necrotrófica da doença. De um outro lado, a expressão do gene *ASP* é mais acentuada na planta sadia, portanto não tendo provavelmente envolvimento nesse processo de morte celular. Teste de atividade proteolítica com amostras do fruto e meristema de cacau sadios e doentes demonstrou que a proteólise está presente em todas as fases, porém, a intensidade da degradação é maior nas plantas necrosadas, podendo estar envolvidas na PCD em *T. cacao*.

Apoio financeiro: IFS, CAPES, MAE.